

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

**0 293 029  
A1**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 88200864.2

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>: **C07D 475/04**

(22) Anmeldetag: 22.04.88

(30) Priorität: 15.05.87 CH 1883/87

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
30.11.88 Patentblatt 88/48

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
ES GR

(71) Anmelder: **EPROVA Aktiengesellschaft**  
**Im Laternenacker 5**  
**CH-8200 Schaffhausen(CH)**

(72) Erfinder: **Müller, Hans Rudolf**  
**Beckenwäldli 18**  
**CH-8207 Schaffhausen(CH)**  
Erfinder: **Ulmann, Martin**  
**Steigstrasse 339**  
**CH-Dachsen(CH)**  
Erfinder: **Conti, Josef**  
**Winkelriesstrasse 22**  
**CH-Schaffhausen(CH)**  
Erfinder: **Mürdel, Günter**  
**vor Hegin**  
**D-7088 Tengen-Büsslingen(DE)**

(54) **Verfahren zur Trennung von Folinsäure.**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von (6S)-Folinsäure bzw. deren Salzen durch Umkristallisation von Erdalkalisalzen der (6R,S)-Folinsäure und gegebenenfalls Freisetzung der Säure aus den Erdalkalifolinnaten und/oder gegebenenfalls Ueberführung in die Alkalisalze durch mindestens eine Umkristallisation in Gegenwart einer Base.

Die Erfindung betrifft ausserdem die Calcium-, Magnesium-, Kalium- und Natrium- (6S)-Folinate sowie die erfindungsgemäss hergestellte (6S)-Folinsäure.

**EP 0 293 029 A1**

## Verfahren zur Trennung von Folsäure

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von (6S)-Folinsäure bzw. von deren Salzen, insbesondere des Calcium-, Magnesium-, Kalium- und Natriumfolinats.

Folinsäure ist N-(5-Formyl-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-pteroyl)-L-glutaminsäure (5-CHO-(6R,S)-H<sub>4</sub>PteGlu). N-(5-Formyl-(6S)-5,6,7,8-tetrahydropteroyl)-L-ityovorum).

5 Folinsäure enthält 2 asymmetrische Zentren. Dabei liegt aufgrund der Synthese der Folinsäure aus Folsäure, der N-(Pteroyl)-L-glutaminsäure, das im Glutaminsäure-Rest enthaltene optisch aktive C-Atom in der L-Form vor, während das durch Hydrierung der Doppelbindung in 5,6-Stellung des Pteroyl-restes entstandene optisch aktive C-Atom in Position 6 in der racemischen, der (6R,S)-Form, vorliegt. Synthetische Folinsäure (= Leucovorin) besteht demnach aus einer 1:1-Mischung von zwei Diastereomeren.

10 Leucovorin findet zunehmende Bedeutung als Arzneimittel zur Behandlung von megaloblastischer Folsäuremangel-Anämie, als Antidot zur Verstärkung der Verträglichkeit von Folsäure-Antagonisten speziell von Aminopterin und Methotrexat in der Krebstherapie (leucovorin rescue) und der Behandlung von Autoimmunkrankheiten wie Psoriasis und rheumatischer Arthritis sowie zur Verstärkung der Verträglichkeit von bestimmten Antiparasitika etwa Trimethoprim-Sulfamethoxazol in der Chemotherapie.

15 In natürlichen Vorkommen, z.B. in der Leber, findet man die Folinsäure nur in der S-Form. Die biochemische Wirkung von Leucovorin als Folsäure Cofaktor beruht auf dessen Gehalt an 5-CHO-(6S)-H<sub>4</sub>PeGlu. Die inverse (R)-Form -5-CHO-(6R)-H<sub>4</sub>PteGlu- dagegen wird kaum metabolisiert und langsam durch den Urin ausgeschieden. Sie ist biochemisch unwirksam. J.A. Straw et al, Cancer Research 44, 3114 (1984).

20 Es sind daher mehrfach Anstrengungen zur Trennung von 5-Formyl-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydropteroyl-L-glutaminsäure und zur asymmetrischen Synthese von 5-Formyl-(6S)-5,6,7,8-tetrahydropteroyl-L-glutaminsäure und Isolierung der physiologisch aktiven Form unternommen worden. D. Cosulich et al, J. Amer. chem. Soc. 74, 4215-16 (1952), US Patentschrift 2'688'018 haben versucht, die Trennung durch fraktionierte Kristallisation eines Erdalkali-salzes, z.B. des Calcium- oder Strontium-salzes, von 5-Formyl-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydropteroyl-L-glutaminsäure aus wässriger Lösung zu bewerkstelligen.

25 Unter den von B. Cosulich et al offenbarten Bedingungen lässt sich die gewünschte Trennung nicht realisieren. Bei der Kristallisation z.B. des Calcium-salzes von 5-Formyl-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydropteroyl-L-glutaminsäure quantitativ nachweisen lässt. Dabei ist es unerheblich, ob man rohes oder reines Calciumsalz von 5-CHO-(6R,S)-H<sub>4</sub>PteGlu zur Kristallisation einsetzt, stets wird die optisch reine (6R,S)-Form zurückerhalten. Eine Trennung und Anreicherung der (6S)-Form kann auch nicht erreicht werden, wenn man 30 die übersättigte wässrige Lösung von Erdalkali-(6R,S)-Folinat mit authentischem Erdalkali-(6S)-Folinat impft. Damit blieb bis heute die asymmetrische Synthese als einzige Möglichkeit zur Gewinnung von N-(5-Formyl-(6S)-5,6,7,8-tetrahydropteroyl)-L-glutaminsäure. Die bisher bekannten Methoden der asymmetrischen Synthese von (6S)-Folinsäure sind jedoch zur Herstellung dieser Verbindung im technischen Massstab nicht 35 geeignet. Es gibt daher bis heute keine technisch brauchbare Methode zur Gewinnung von (6S)-Folinsäure.

Es bestand somit die Aufgabe, eine einfache, technisch brauchbare und wirtschaftliche Methode zur Herstellung von (6S)-Folinsäure und ihrer Salze zu erarbeiten.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass bei der Umkristallisation von Erdalkalisalzen von (6R,S)-Folinsäure, z.B. von Calcium-, Magnesium- oder Strontium-N-(5-Formyl-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydropteroyl)-L-glutaminat (= Erdalkali-(6R,S)-Folinat), vorzugsweise aus Wasser, in Gegenwart von anorganischen oder 40 organischen Basen in alkalischem Milieu zunächst vorwiegend die (6S)-Form auskristallisiert, wobei der Gehalt an der (6S)-Form im Kristallat 85 % und mehr erreichen kann.

Das mit der (6S)-Form stark angereicherte Erdalkali-Folinat mit einem hohen (6S)-Form-Gehalt lässt sich gegebenenfalls durch weitere Umkristallisation, vorzugsweise aus Wasser bei etwa neutralem pH, in optisch 45 reines Erdalkali-(6S)-Folinat überführen.

Bei der Kristallisation kann die Ausbeute durch Zusatz von Erdalkalitionen, z.B. von Calcium-, Magnesium oder Strontiumchlorid, verbessert werden.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Herstellung von (6S)-Folinsäure bzw. deren Salzen durch Umkristallisation von Erdalkalisalzen der (6R,S)-Folinsäure und gegebenenfalls Freisetzung 50 der Säure aus den Erdalkalifolinaten und/oder gegebenenfalls Ueberführung in die Alkalisalze, das sich dadurch auszeichnet, dass die Umkristallisation in Gegenwart einer Base durchgeführt wird.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren, bei dem das erhaltene Kristallat in Gegenwart einer Base oder bei annähernd neutralem pH-Wert mindestens einer weiteren Umkristallisation unterworfen wird. Nach einer bevorzugten Ausführungsform werden die Umkristallisationen in Gegenwart von zusätzlichen Erdalkali-Ionen durchgeführt. Als Ausgangsmaterial für das Verfahren sind sowohl reine Erdalkali-(6R,S)-

Folinate als auch rohe Erdalkali-(6R,S)-Folinate geeignet.

Durch dieses Verfahren sind das Calcium- und Magnesium-salz von N-(5-Formyl-6S)-5,6,7,8-tetrahydropteroyl)-L-glutaminsäure erstmals technisch zugänglich geworden.

Als Erdalkalisalze von Folinsäure kommen in Betracht das Calcium-, Magnesium-, Strontium- und Barium-Folinat. Vorgezogen werden das Calcium- und Magnesium-Folinat, weil diese nach erfolgter Trennung direkt als Arzneimittel verwendbar sind, während etwa das Strontium- und vor allem das Barium-Salz anschliessend in ein anderes, physiologisch annehmbares, Salz umgewandelt werden.

Als anorganische oder organische Basen kommen beispielsweise in Betracht:

Alkalihydroxide wie Natrium-, Kalium- und Lithium-hydroxid,  
 10 Erdalkalihydroxide wie insbesondere Calcium- und Magnesium-hydroxid, Ammoniak, Hydrazin, wasserlösliche organische Basen, insbesondere einfache primäre, sekundäre, tertiäre Amine, z.B. Methylamin, Dimethylamin, Trimethylamin, Ethylamin, Diethylamin, Triethylamin, Propylamin, Dipropylamin, Methylethylamin, Aminoalkohole, z.B. Ethanolamin, Diethanolamin, Triethanolamin, Propanolamine, Butanolamine, Dihydroxypropylamine (2,3-Dihydroxypropylamin, Serinol), Trihydroxybutylamine (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan),  
 15 Glucamin, N-Methyl-glucamin, heterocyklische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Morpholin oder Piperazin.

Die erste Umkristallisation nach dem erfindungsgemässen Verfahren wird bei einem pH-Wert zwischen 8,5 und 12, vorzugsweise zwischen 9,0 und 10,5, durchgeführt. Bei tieferem pH erfolgt keine deutliche  
 20 Anreicherung der (6S)-Form im Kristallisat, bei höherem pH wird die Stabilität der Folinsäure merklich geringer und zudem sind die Erdalkalisalze kaum noch zur Kristallisation zu bringen.

Zur Entfernung restlicher Mengen von (6R)-Folinat aus Erdalkali-(6S)-Folinat können weitere Umkristallisationen auch in annähernd neutralem Milieu z.B., im pH-Bereich von 6,5 bis 8,5, durchgeführt werden. Bei den Umkristallisationen kann durch Zusatz von entsprechenden Erdalkali-Ionen das Löslichkeitsprodukt rascher erreicht und damit die Ausbeute gesteigert werden. Die Erdalkali-Ionen, vorzugsweise Ca, Mg, Sr,  
 25 werden in Form beliebiger leicht löslicher Salze zugefügt, beispielsweise in Form der Chloride, Sulfate oder Nitrate. Sie werden in der Regel in der 0,2 bis 4fachen Menge des Folinats eingesetzt.

Gegenstand der Erfindung sind auch die durch das erfindungsgemässe Verfahren erstmals technisch zugänglichen (6S)-Folinate, insbesondere das Calcium-folinat und die (6S)-Folinsäure sowie, unabhängig  
 30 von der Methode seiner Herstellung, das neue Magnesiumsalz und das aus den nun gut zugänglichen Erdalkali-(6S)-Folinen, z.B. durch Umsalzen leicht erhältliche neue Natrium- und Kalium-(6S)-Folinat.

Das Magnesium-(6S)-Folinat ist von herausragender Bedeutung, weil es aufgrund seiner vergleichsweise guten Wasserlöslichkeit von mehr als 2 g/100 ml und seiner hohen Verträglichkeit das geeignete Ausgangsmaterial für die Herstellung von Injektionslösungen bildet. Noch mehr gilt dasselbe für das Natrium- und  
 35 Kalium-(6S)-Folinat.

Das Calcium-(6S)-Folinat vermag bei 20° C nur 0.95 %ige wässrige Lösungen zu bilden, was die Herstellung von Injektionslösungen erschwert.

40 Beispiele zur Illustrierung der Erfindung:

#### Beispiel 1

#### Calcium-(6S)-Folinat

1. Kristallisation:

100 g rohes Calcium-(6R,S)-Folinat in ca 1 Liter warmem Wasser von 50 - 60 °C werden mit 12 - 36 g Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) bei 18 °C kristallisieren gelassen. Nach 18 - 20 Stunden wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit verdünnter Calciumchlorid-Lösung und danach mit wasserfeuchtem Ethanol gewaschen.  
Man erhält 41 g Calcium-Folinat enthaltend 88 % Calcium-(6S)-Folinat und 12 % Calcium-(6R)-Folinat. Optische Ausbeute 72 %.

2. Kristallisation

40 g rohes Calcium-(6R,S)-Folinat aus der 1. Kristallisation enthaltend 88 % (6S)-Folinat, werden bei 55 - 60 °C in Wasser gelöst und langsam mit wässriger Salzsäure (20 %ig) bis zum pH 6,1 und mit 40 bis 160 g Calciumchlorid versetzt. Bei 55 °C wird durch Zusatz von Natronlauge das pH der Lösung auf 7 bis 7,5 eingestellt. Bei etwa 35 °C wird mit authentischem Calcium-(6S)-Folinat geimpft und bei 18 - 20 °C das Produkt kristallisieren gelassen.  
Nach etwa 40 Stunden wird das auskristallisierte Produkt abfiltriert, mit wässrigem Ethanol gewaschen und getrocknet.  
Man erhält 30,4 g Calcium-(S)-Folinat mit einem Gehalt an (S)-Folinat von 98 %. Optische Ausbeute: 79 - 81 %.

3. Kristallisation:

10 g Calcium-(6S)-Folinat mit einem Gehalt an (6S)-Form von 94 - 98 % werden in heissem Wasser gelöst, mit 10 g Calciumchlorid versetzt und bei pH 7,0 bis 7,5 und 18 - 20 °C kristallisieren gelassen. Nach 3 bis 4 Tagen wird das Produkt abfiltriert, mit wenig Wasser und mit feuchtem Ethanol gewaschen und getrocknet.  
Man erhält 8 g reines Calcium-(6S)-Folinat.  
Gehalt an Calcium-(6S)-Folinat = 99 - 100 Flächen%  
Löslichkeit in Wasser: 0,95 g/100 ml bei 20 °C und 1,5 g/100 ml bei 40 °C  
Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20} = -15^\circ$  (bezogen auf wasserfreies Ca-Salz)

Anmerkungen:

Gehalt an CaFolinat: Bestimmt mittels HPLC gegen Standard.  
Gehalt an (6S)-Form: Bestimmt mittels HPLC unter Verwendung einer chiralen Säule (Resolvosil-BSA-7).

Beispiel 2

Trennung von Calcium-(6R,S)-Folinat durch Kristallisation in Gegenwart von verschiedenen Basen

1. Umkristallisation in Gegenwart von Basen.

30 g Calcium-(6R,S)-Folinat werden bei 50 °C in 200 - 300 ml Wasser gelöst, bei 30 - 40 °C mit 0,5 - 0,6 Äquivalent Base pro Mol Calcium-(6R,S)-Folinat versetzt.  
Die Lösung wird bei Raumtemperatur während 5 bis 17 Stunden gerührt. Gewöhnlich tritt bald spontane

Kristallisation ein.

Das Kristallisat wird abfiltriert, mit wenig 5 %iger Calciumchlorid-Lösung und mit Ethanol gewaschen und getrocknet.

Die Ergebnisse sind aus der Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle 1

Base	pH	Gehalt an (6S)- Form Flächen%	Ca-Folinat*5H <sub>2</sub> O Gew. %	optische Ausbeute %
Kein Basenzusatz	7.5	50.1	99	keine Auftrennung
Natriumhydroxid	8.5	52	101	beginn. Auftrennung
NaOH	10	80	96	70
Magnesiumhydroxid	10	72	97.2	60
Calciumhydroxid	10.2	79	93.4	65
Aminobutanol	9.6	71	96.5	70
Ethanolamin	10	85	97.5	75
Diethanolamin	9.7	75	97.2	60
Serinol	9.6	75	98.2	75
Methylamin	10	79	96.5	76
Ethylamin	9.9	82	97.5	78
Ammoniak	10	84	98.9	72
Hydrazin	10	83	97	72
Kaliumhydroxid	9.5	77	98.2	70

2. Umkristallisation der nach 1. erhaltenen rohen Calcium-(6S)-Folinate.

Die nach vorstehender Methode 1 erhaltenen rohen Calcium-(6S)-Folinate werden unter Zusatz von 1 - 4 Teilen Calciumchlorid bei pH 6.5 bis 7.5 aus Wasser umkristallisiert. Eine etwas schwerer lösliche Fraktion wird dabei durch Filtration abgetrennt. Aus dem Filtrat kristallisiert nach Einengen und Abkühlen reines Calcium-(6S)-Folinat.

Gehalt an Calcium-(6S)-Folinat = 99.9 Flächen%

### Beispiel 3

#### Magnesium-(6S)-Folinat

1. Kristallisation:

30 g Magnesium-(6R,S)-Folinat, hergestellt aus einer wässrigen Lösung von Natrium-(6R,S)-Folinat durch Fällung mit Magnesiumchlorid, werden in heissem Wasser gelöst, mit 100 g Magnesiumchlorid versetzt und durch Zusatz von wässrigem Natriumhydroxid auf pH 10 gestellt. Nun wird unter Rühren auf 16-18° C abgekühlt.

Nach einigen Tagen wird das auskristallisierte rohe Magnesium-(6S)-Folinat abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und getrocknet. Man erhält ein Magnesium-Folinat mit einem Gehalt von 80 % an (S)-Folinat.

## 2. Umkristallisation:

Durch Umkristallisation bei annähernd neutralem pH aus wenig Wasser unter Zusatz von Magnesiumchlorid erhält man aus dem rohen reines Magnesium-(6S)-Folinat mit einem Gehalt an (6S)-Folinat von mehr als 95 % der Theorie.

Löslichkeit in Wasser: 2,4 g/100 ml bei 20 ° C.

### Beispiel 4

#### Natrium-(6S)-Folinat

Eine praktisch gesättigte wässrige Lösung von Calcium-(6S)-Folinat wird durch eine Ionenaustauschersäule, die mit Kationenaustauscherharz in der Na<sup>(+)</sup>-Form, z.B. mit Amberlite IR-120, Na<sup>(+)</sup>-Form, beschickt ist, perkolieren gelassen. Das Eluat wird konzentriert. Durch Zusatz von Ethanol wird das Natrium-(6S)-Folinat ausgefällt.

Natrium-(6S)-Folinat ist leicht löslich in Wasser.

Alternativ lässt sich das Natrium-(6S)-Folinat auch durch Lösen von (6S)-Folinsäure in der äquivalenten Menge von Natriumhydroxid gewinnen.

Die dazu erforderliche (6S)-Folinsäure wird nach Beispiel 6 erhalten.

### Beispiel 5

#### Kalium-(6S)-Folinat

Diese Verbindung wird erhalten, indem man nach Beispiel 6 erhaltene (6S)-Folinsäure in der äquivalenten Menge von wässrigem Kaliumhydroxid auflöst.

Aus seinen konzentrierten wässrigen Lösungen lässt sich durch Versetzen mit Ethanol, Isopropanol oder Aceton das Kalium-(6S)-Folinat ausfällen.

Kalium-(6S)-Folinat ist leicht löslich in Wasser.

### Beispiel 6

#### (6S)-Folinsäure

Eine wässrige Lösung von Calcium-(6S)-Folinat wird vorsichtig mit verdünnter Salzsäure versetzt, wobei die (6S)-Folinsäure ausfällt und durch Filtration gewonnen wird.

(6S)-Folinsäure ist kaum löslich in Wasser.

## Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von (6S)-Folinsäure bzw. deren Salzen durch Umkristallisation von Erdalkalisalzen der (6R,S)-Folinsäure und gegebenenfalls Freisetzung der Säure aus den Erdalkalifolinen und/oder gegebenenfalls Ueberführung in die Alkalisalze, dadurch gekennzeichnet, dass die Umkristallisation in Gegenwart einer Base durchgeführt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das erhaltene Kristallisat in Gegenwart einer Base oder bei annähernd neutralem pH-Wert mindestens einer weiteren Umkristallisation unterworfen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umkristallisationen in Gegenwart von zusätzlichen Erdalkali-Ionen durchführt.

4. (6S)-Folinsäure und deren Calcium-Salz, hergestellt nach Anspruch 1 oder 2.

5. Magnesium-Salz der (6S)-Folinsäure.

5 6. Natrium- und Kalium-Salz der (6S)-Folinsäure.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 88 20 0864

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
A	BIOCHEMISTRY, Band 20, 31. März 1981, Seiten 1837-1842, American Chemical Society, US; J. FEENY et al.: "Hydrogen-1 nuclear magnetic resonance study of the complexes of two diastereoisomers of folinic acid with dihydrofolate reductase" * Seite 1838 * ---	1	C 07 D 475/04
D,A	US-A-2 688 018 (D.B. COSULICH) * Das ganze Dokument * ---	1	
D,A	JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, Band 74, Nr. 16, 21. August 1952, Seiten 4215-4216, American Chemical Society, US; P.D. COSULICH et al.: "Diastereoisomers of leucovorin" -----	1	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
			C 07 D 475/00
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 02-09-1988	Prüfer LUYTEN H.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	





Europäisches  
Patentamt  
European Patent  
Office  
Office européen  
des brevets

Description of EP0293029

Print

Copy

Contact Us

Close

## Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

### Method to the separation of foil-acidic

The invention relates to a method to the preparation of (6S) - foil-acidic and/or. of their salts, in particular the calcium, magnesium, potassium and Natriumfolinats.

Foil-acidic is n (5-Formyl (6R, S) - 5,6,7,8-tetrahydro-pteroyl) - L-glutaminsäure (5-CHO (6R, S) - H4PteGlu). N (5-Formyl (6S) - 5,6,7,8-tetrahydropteroyl) - L-glutaminsäure (5-CHO (6S) - H4PteGlu) is the Citrovorum factor (= growth factor for *Leuconostoc citrovorum*).

Foil-acidic contains 2 asymmetric centers. The foil-acidic from folic acid due to the synthesis, which n (Pteroyl, lies) - L-glutaminsäure, in the glow amine acid residue contained optical active carbon atom in the L shape forwards, while by hydrogenation of the double bond in 5,6-Stellung of the Pteroyl remainder developed optical active carbon atom in position 6 in the racemic, (6R, S) - form, is present. Therefore consists synthetic foil-acidic (= Leucovorin) of a 1:1 - mixture of two Diastereomeren.

Leucovorin finds increased meaning as drug to the treatment of megaloblastischer Folsäuremangel anaemia, as antidote to the reinforcement of the compatibility of Folsäure antagonists particular of aminopterin and methotrexate in the cancer therapy (leucovorin rescue) and the treatment of autoimmune diseases such as psoriasis and rheumatoid arthritis as well as to the reinforcement of the compatibility from certain Antiparasitika for instance to Trimethoprim Sulfamethoxazol in the chemotherapy.

In natural occurrences, e.g. in the liver, one finds the foil-acidic only in the S-form. The biochemical effect of Leucovorin as folic acid cofactor is based to H4PteGlu on its content at 5-CHO (6S) -. The inverse (R) - form -5-CHO (6R) - H4PteGlu against it is hardly metabolisiert and slow by the urine excreted. It is biochemical ineffective. J.A. Straw et al., CAN cerium Research 44, 3114 (1984).

There is therefore multiple efforts to the separation of 5-Formyl (6R, S) - 5,6,7,8-tetrahydropteroyl-L-glutaminsäure and to the asymmetric synthesis of 5-Formyl (6S) - 5,6,7,8-tetrahydropteroyl-L-glutaminsäure and isolation of the physiological active form undertaken. D. Cosulich et al., J. Amer. chem. Soc. 74, 4215-16 (1952), US patent specification 2 ' 688 ' 018 has attempted, the separation by fractional crystallization of an alkaline-earth salt, e.g. the calcium or strontium salt, from 5-Formyl (6R, S) - to manage 5,6,7,8-tetrahydropteroyl-L-glutaminsäure from aqueous solution. Bottom one of B. Cosulich et al. disclosed conditions cannot be realized the desired separation. With the crystallization e.g. the calcium salt of 5-Formyl (6R, S) - 5,6,7,8-tetrahydropteroyl-L-glutaminsäure from water with pH 7-8 becomes pure 6R, S-form obtained again and again, as by means of chromatographic analysis at a chiral HPLC column as well as on the basis the optical rotation quantitative can be proven. It is insignificant, whether one crude or pure calcium salt of 5-CHO (6R, S) - H4PteGlu to the crystallization uses always becomes the optical pure (6R, S) - form gets back. A separation and an enrichment (6S) - of the form cannot also achieved become, if one the supersaturated aqueous solution of alkaline-earth (6R, S) - Folinat with authentic alkaline-earth (6S) - Folinat inoculates. Thus remained to today the asymmetric synthesis as only way to the recovery of n (5-Formyl (6S) - 5,6,7,8-tetrahydropteroyl) - L-glutaminsäure. Die known methods of the asymmetric synthesis of (6S) - foil-acidic are not however suitable to the preparation of this compound in the technical yardstick. It gives therefore to today no technical useful method to the recovery of (6S) - foil-acidic.

There was thus the object, a simple, technical useful and economic method to the preparation of (6S) - foil-acidic and their salts to compile.

It was found now surprising that with the recrystallization of alkaline-earth salts of (6R, S) - foil-acidic, e.g. of calcium, magnesium or strontium n (5-Formyl (6R, S) - 5,6,7,8-tetrahydropteroyl) - L-glutaminat (= alkaline-earth (6R, S) - Folinat), preferably from water, in presence of inorganic or organic bases in alkaline environment first predominantly (6S) the form crystallized, whereby that content to (6S) - form in the Kristallisat 85% and more to reach can. With (6S) - the form strong the enriched alkaline-earth Folinat with an high (6S) - form content can be transferred if necessary by other recrystallization, preferably from water with approximately neutral pH, in optical pure alkaline-earth (6S) - Folinat.

With the crystallization the yield can by addition of alkaline-earth ions, e.g. by calcium, magnesium or strontium chloride, to be improved.

Subject-matter of the invention is thus a method to the preparation of (6S) - foil-acidic and/or. their salts by recrystallization of alkaline-earth salts (6R, S) - foil-acidic and if necessary release of the acidic ones from the Erdalkalifolinen and/or if necessary transfer into the alkali salts, which are characterised by the fact that the recrystallization in presence of a base becomes conducted.

Furthermore subject-matter of the invention is a method, with which the obtained Kristallisat in presence of a base is subjected or at approximate neutral pH value at least to an other recrystallization. After a preferable embodiment the recrystallizations in presence of additional alkaline-earth ions become conducted. As starting material for the method both pure alkaline-earth (6R, S) is - Folate and crude alkaline-earth (6R, S) - Folate suitable.

By this method the calcium and Magnesium-salz of n (5-Formyl-6S) are - 5,6,7,8-tetrahydropteroyl) - L-glutaminsäure for the first time technical accessible become.

As alkaline-earth salts of foil-acidic come into considerations the calcium, magnesium, strontium and barium Folinat. The calcium and magnesium Folinat are preferred, because these after made separation direct are more useful as drugs, while for instance the strontium and above all become the barium salt subsequent into another, physiological acceptable, salt converted.

As inorganic or organic bases come for example into considerations:

Alkali hydroxides such as sodium, potassium and lithium hydroxide,

Alkaline-earth hydroxides like in particular calcium and Magnesium-hydroxid, ammonia, hydrazine, water-soluble organic bases,

simple, secondary, primary in particular, tertiary amines, e.g. Methylamine, dimethylamine, trimethylamine, ethylamine, diethylamine, triethylamine, propylamine, Dipropylamin, methyl ethyl amine,

Aminoalkohole, e.g. Ethanolamine, Diethanolamin, triethanolamine, Propanolamine, Butanolamine, Dihydroxypropylamine (2,3-Dihydroxypropylamin, Serinol), Trihydroxybutylamine (trichloroethylene (hydroxymethyl) - aminomethan), Glucamin, N-methyl-glukamin,

heterocyklische amines, e.g. Pyrrolidin, piperidine, morpholine or piperazine.

The first recrystallization after the invention process becomes at a pH value between 8,5 and 12, preferably between 9,0 and 10,5, conducted. With deeper pH made no significant enrichment (6S) - form in the Kristallisat, with higher pH the stability the foil-acidic significant smaller and besides are the alkaline-earth salts hardly still to the crystallization will bring. To the removal of residual amounts of (6R) - Folinat from alkaline-earth (6S) - Folinat can become other recrystallizations also in approximate neutral environment e.g., in the pH range from 6,5 to 8,5, conducted. With the recrystallizations the Löslichkeitsprodukt can become more rapidly achieved and thus the yield increased by addition of corresponding alkaline-earth ions. The alkaline-earth ions, preferably approx., mg, Sr, become added, for example in form of the chlorides, in form of arbitrary light soluble salts, sulfates or nitrates. They become usually used in the 0.2 to 4fachen amount of the Folinats.

Subject-matter of the invention are also for the first time the accessible (6S) - Folate technical by the invention process, in particular calcium folinat and (6S) - foil-acidic as well as, independent of the method its preparation, the new magnesium salt and from the good accessible alkaline-earth (6S) - the Folinaten, e.g. by Umsalzen light available new sodium and potassium (6S) - Folinat.

The magnesium (6S) - Folinat is of excellent importance, because it forms the suitable starting material for the preparation for its high compatibility due to its comparatively good water solubility of more than 2 g/100 ml and injection solutions.

Still more the same applies for Folinat to the sodium and potassium (6S) -

The calcium (6S) - Folinat is able to form ige aqueous solutions for 0,95% with 20 DEG C only, which makes the preparation more difficult of injection solutions.

Examples for the illustration of the invention:

#### Example 1

#### Calcium (6S) - Folinat

##### 1. Crystallization:

100 g crude calcium (6R, S) - Folinat in approx. 1 liter warm water of 50 - 60 DEG C become with 12 - 36 g calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) staggered, with 30 DEG C by addition of aqueous ammonia (25% industrial union) on pH 10 adjusted and with 18 DEG C crystallize calmly. After 18 - 20 hours the excreted product filtered becomes, with diluted calcium chloride solution and afterwards with water-wet ethanol washed. One receives contained 88% calcium (6S) to 41 g calcium Folinat - Folinat and 12% calcium (6R) - Folinat. Optical yield 72%.

##### 2. Crystallization

40 g crude calcium (6R, S) - Folinat from the 1. Crystallization contained 88% (6S) - Folinat, become with 55 - 60 DEG C in water dissolved and slow with aqueous hydrochloric acid (20% industrial union) up to the pH 6.1 and with 40 to 160 g calcium chloride staggered. With 55 DEG C the pH of the solution on 7 to 7.5 becomes by addition of sodium hydroxide solution. adjusted. With approximately 35 DEG C becomes with authentic calcium (6S) - Folinat seeded and with 18 - 20 DEG C the product crystallize calmly.

After approximately 40 hours the crystallized product becomes filtered, dried with aqueous ethanol washed and. One receives 30.4 g calcium (S) - Folinat with a content on (S) - Folinat of 98%. Optical yield: 79 - 81%.

##### 3. Crystallization:

10 g calcium (6S) - Folinat with a content on (6S) - form of 94 - 98% become in hot water dissolved with 10 g calcium chloride staggered and with pH 7,0 to 7,5 and 18 - 20 DEG C crystallize calmly. After 3 to 4 days the product becomes filtered, with little water and with wet ethanol washed and dried.

One receives pure calcium (6S) to 8 g - Folinat.

Content at calcium (6S) - Folinat = 99 - 100 Flächen%

Solubility in water: 0.95 g/100 ml with 20 DEG C and 1,5 g/100 ml with 40 DEG C

Specific rotation [alpha] 20\_D = - 15 DEG (related to anhydrous approx.-salt)

Notes:

Content at CaFolinat: Certain one by means of HPLC against standard.

- ▲ top Content on (6S) - form: Certain one by means of HPLC using a chiral column (Resolvosil-BSA-7).

#### Example 2

Separation of calcium (6R, S) - Folinat by crystallization in presence of various bases

##### 1. Recrystallization in presence of bases.

30 g calcium (6R, S) - Folinat become with 50 DEG C in 200 - 300 ml waters dissolved, with 30 - 40 DEG C with 0,5 - 0.6 Aequivalent base per mol calcium (6R, S) - Folinat staggered.

The solution with room temperature during 5 to 17 hours one rests. Ordinary one occurs soon spontaneous crystallization. The Kristallisat becomes filtered with few 5% iger calcium chloride solution and with ethanol washed and dried.

The results are 1 apparent from the table.

<tb>< TABLE> Id=Tabelle 1 Columns=5

<tb>

<tb> Head Col 1: Base

<tb> Head Col 2: pH

<tb> Head Col 3: Content on (6S) - form Flächen%

<tb> Head Col 4: Ca-Folinat.5H<sub>2</sub>O Gew, %

<tb> Head Col 5: optical yield %

<tb> no cousin additive< September> 7,5< September> 50,1< September> 99 <September> no separation

<tb> sodium hydroxide< September> 8,5< September> 52< September> 101 <September> beginning. Auftrenng

<tb> NaOH< September> 10< September> 80< September> 96< September> 70

<tb> magnesium hydroxide< September> 10< September> 72< September> 97,2< September> 60

<tb> calcium hydroxide< September> 10,2< September> 79< September> 93,4< September> 65

<tb> Aminobutanol< September> 9,6< September> 71< September> 96,5< September> 70

<tb> ethanolamine< September> 10< September> 85< September> 97,5< September> 75

<tb> Diethanolamin< September> 9,7< September> 75< September> 97,2< September> 60

<tb> Serinol< September> 9,6< September> 75< September> 98,2< September> 75

<tb> methylamine< September> 10< September> 79< September> 96,5< September> 76

<tb> ethylamine< September> 9,9< September> 82< September> 97,5< September> 78

<tb> ammonia< September> 10< September> 84< September> 98,9< September> 72

<tb> hydrazine< September> 10< September> 83< September> 97< September> 72

<tb> potassium hydroxide< September> 9,5< September> 77< September> 98,2< September> 70

<tb>< /TABLE>

##### 2. Recrystallization after 1. obtained crude calcium (6S) - Folate.

After managing method 1 obtained the crude calcium (6S) - Folate become bottom addition of 1 - 4 parts calcium chloride recrystallized with pH 6,5 to 7,5 from water. A somewhat heavy soluble fraction becomes separated thereby by filtration. From the filtrate crystallized after restricting and cooling pure calcium (6S) - Folinat.

Content at calcium (6S) - Folinat = 99,9 Flächen%

#### Example 3

Magnesium (6S) - Folinat

##### 1. Crystallization:

30 g magnesium (6R, S) - Folinat, prepared from an aqueous solution of sodium (6R, S) - Folinat by precipitation with magnesium chloride, are versezt in hot water dissolved, with 100 g magnesium chloride and by addition of aqueous sodium hydroxide on pH 10 provided. Now bottom agitations on 16-18 DEG C cooled becomes.

After some days the crystallized crude magnesium (6S) becomes - Folinat filtered, with ethanol washed and dried. One receives a magnesium Folinat with a content from 80% on (S) - Folinat.

##### 2. Recrystallization:

By recrystallization with approximate neutral pH from little water bottom addition of magnesium chloride one receives from the crude pure magnesium (6S) - Folinat with a content on (6S) - Folinat of more than 95% of the theory.

Solubility in water: 2.4 g/100 ml with 20 DEG C.

#### Example 4

Sodium (6S) - Folinat

A practical satisfied aqueous solution of calcium (6S) - Folinat becomes by an ion exchanger column, those with cation exchange resin in the well< (+)> - form, e.g. with Amberlites IR-120, well< (+)> - form, charged is, perkoliieren calmly. The eluate becomes concentrated. By addition of ethanol the sodium (6S) becomes - Folinat precipitated.

Sodium (6S) - Folinat is light soluble in waters.

Alternative one leaves itself the sodium (6S) - Folinat also by release from (6S) - foil-acidic in the equivalent amount of sodium hydroxide to win.

To it the required (6S) - foil-acidic becomes 6 obtained after example.

#### Example 5

Potassium (6S) - Folinat

This compound becomes obtained, by one after example 6 obtained (6S) - foil-acidic in the equivalent amount of aqueous potassium hydroxide dissolves.

From its concentrated aqueous solutions the potassium (6S) - Folinat can be precipitated by shifting with ethanol, isopropanol or acetone.

Potassium (6S) - Folinat is light soluble in waters.

#### Example 6

(6S) - foil-acidic

An aqueous solution of calcium (6S) - Folinat becomes careful staggered with diluted hydrochloric acid, whereby (6S) - foil-acidic precipitates and by filtration recovered becomes.

(6S) - foil-acidic is hardly soluble in waters.



Europäisches  
Patentamt  
European Patent  
Office  
Office européen  
des brevets

[Claims of EP0293029](#)[Print](#)[Copy](#)[Contact Us](#)[Close](#)

## Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

1. Method to the preparation of (6S) - foil-acidic and/or. their salts by recrystallization of alkaline-earth salts (6R, S) - foil-acidic and release of the acidic ones from the Erdalkalifolinen and/or transfer into the alkali salts, characterised in that the recrystallization in presence of a base conducted become if necessary if necessary.
2. Process according to claim 1, characterised in that the obtained Kristallisat in presence of a base or at approximate neutral pH value is subjected at least an other recrystallization.
3. Process according to claim 1 and 2, characterised in that one the recrystallizations in presence of additional alkaline-earth ions accomplishes.
4. (6S) - foil-acidic and their calcium salt, prepared according to claim 1 or 2.
5. Magnesium-Salz (6S) - of the foil-acidic.

▲ top 6. Sodium and potassium salt (6S) - of the foil-acidic.